

Cumulative enzyme release in liver disease

Citation for published version (APA):

Peltenburg, H. G. (1989). *Cumulative enzyme release in liver disease*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse. <https://doi.org/10.26481/dis.19890526hp>

Document status and date:

Published: 01/01/1989

DOI:

[10.26481/dis.19890526hp](https://doi.org/10.26481/dis.19890526hp)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 8

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Over the last thirty years the plasma activities of liver enzymes, e.g. alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (AP), gamma-glutamyltransferase (GGT), ornithine carbamyltransferase (OCT) and glutamate dehydrogenase (GLDH) have been used extensively in clinical diagnosis of liver disease. In contrast to the situation for the heart, release of enzymes from the liver has seldom been used to assess the extent of organ damage. In the heart, necrotic tissue is not replaced by muscle cells and cumulative enzyme release thus reflects irreversible loss of functional tissue. The liver, however, has a large regenerative capacity and estimation of hepatic necrosis will not be directly related to residual liver function.

In spite of this limitation, however, the liver is much more interesting than the heart from the point of view of clinical enzymology. Different types of hepatic injury have been related to different patterns of enzyme release. For instance, the solubilization of membrane enzymes, as observed during cholestasis, is thought to reflect the detergent action of accumulated bile acids and an extensive induction of enzymes in hepatocytes that remain relatively healthy and well-perfused. Massive release of cytosolic liver enzymes with limited or delayed release of mitochondrial enzymes may indicate primary injury to the plasma membrane in various forms of toxic liver damage whereas, in contrast, simultaneous release of enzymes from different organelles is observed in acute liver necrosis due to shock or right-side heart failure. Due to induction or inhibition of the synthesis of different enzymes, hepatic enzyme content may be profoundly changed in various forms of liver disease and it would be of major diagnostic value if such changes could be detected from altered ratios of released enzymes in plasma. Data on the intracellular turnover rates of different enzymes can be related to the daily loss of these enzymes in plasma during chronic liver disease. This may allow conclusions about the contribution of cellular disruption versus leakage of enzymes from viable cells as the main mechanisms of enzyme release, and also about the remaining regenerative capacity of the liver.

It has long been realized, however, that these aspects cannot be studied quantitatively by simple measurement of plasma enzyme activities. Due to enzyme-dependent elimination rates from plasma, and also due to exchange of enzymes between vascular and extravascular enzyme pools, the enzyme activities in plasma present a distorted picture of the total released activities. Moreover, the degree of distortion is dependent on the time course of release and will be larger in a long-lasting chronic type of release

than after a short burst of massive enzyme leakage. The main goal of the present thesis is to overcome this limitation and to develop methods by which the total 'cumulative' release of enzymes in plasma can be calculated, taking account of intravascular catabolism, extravasation and extravascular return of enzymes.

In Chapter 1 the pitfalls are discussed, that may be encountered if in the determination and interpretation of cumulative enzyme release. Also the methods, by which the activity of the enzymes is assayed, are described. For most enzymes there are standard spectrophotometrical procedures, using commercially available test kits. For the determination of OCT activity, however, a new method has been developed (Chapter 2), that circumvents urease and deproteinization steps, and is based on enzymatic determination of ammonia.

Estimation of cumulative release necessitates the parameter values of the Fractional Catabolic Rate constants (FCR) of the liver enzymes under study. The method, by which these parameters can be estimated, is explained in Chapter 3, and is applied to the time-activity curves of selected patients with acute massive release of cytosolic liver enzymes. It is shown that the apparent disappearance rates of enzyme activities from plasma, reported in several studies in the literature, underestimate the true values of FCR by factors of about 1.5 to 3. Using the values of FCR(ALT), FCR(ALT), and FCR(LDH) thus obtained, it is demonstrated that these enzymes are released in plasma in proportion to their presence in liver tissue and this finding indicates that altered hepatic enzyme activities may indeed be detected by altered ratios of cumulative release in plasma. It is also shown that the mean extent of injury in this selected group of patients is considerable and corresponds to more than 400 gram-equivalents of liver tissue.

A slightly different method was used in Chapter 4 to estimate the values of FCR for three mitochondrial enzymes, mAST, OCT, and GLDH. Because the time-activity curves of patients with liver disease were selected on the presence of the initial upstroke (necessary to estimate the proportion of released activities - cf. Chapter 3), this has also produced unusually complete curves of mitochondrial enzyme release. The mAST activities measured in acute liver necrosis appear to be much higher than previously published, probably because the activities were measured so early in the event and because mAST is rapidly catabolized. A remarkable synchronism of both cytosolic and mitochondrial enzyme release has been observed, questioning the validity of the reperfusion model for temporary ischemia in vivo, which claims a delay in the release of the mitochondrial enzyme fraction. Probably, the reperfusion injury in these models results in an unphysiological, selective destruction of the plasma membrane (Chapter 4).

As for the relevance of enzymes as a biomarker for liver cell necrosis, OCT and mAST release appears to be more complete than release of GLDH, possibly related to a circulating inhibitor that has been demonstrated for the latter enzyme in Reye's syndrome. If methodological problems have been solved (Chapter 2), OCT appears to be a suitable, liver-specific biomarker (Chapter 4). In alcohol abuse the value of mAST as a biomarker has already been advocated.

The values of FCR(AP) and FCR(GGT) are estimated in patients with acute cholestasis (Chapter 5). This estimation is based on the very slow rate of elimination of

both enzymes which allows determination of the apparent disappearance rates more than 100 hours after the acute event, when it can be assumed that no residual release occurs.

The release of membrane-bound enzymes does not indicate incipient liver cell necrosis. On the contrary, there appears to be an inverse relation between the release of membrane-bound enzymes and cytosolic enzyme release. It seems as if prolonged exposure to bile acids first produces induction and solubilization of membrane-bound enzymes and eventually results in liver cell necrosis from chronic detergent injury.

A decreased content of LDH in patients with 'acute' cholestatic liver injury has been demonstrated by comparison of ratios of released cumulative activities and confirms data obtained from biopsies in the literature. As the intracellular turnover of LDH is quite slow (> 16 days), this finding suggests that the liver has been exposed to the effect of bile acids long before the patient experiences any complaint.

A decreased content of ALT as evidenced by altered ratios of released cumulative activities has been demonstrated in alcoholic liver injury, completely in agreement with previous investigations on liver enzyme content in various forms of alcoholic liver disease. The well-known elevated AST/ALT ratio in alcoholic liver injury mirrors this ALT decrease, but does not represent the true magnitude of this effect. It is shown, for instance, that the AST/ALT ratio of plasma activities decreases when the patients pass from an acute to a chronic phase, whereas the ratio of cumulative release of both enzymes remains unaltered.

A daily cumulative enzyme release equivalent to 8 grams of liver tissue per day has been calculated in ambulatory patients with alcohol abuse. The slow intracellular turnover rate of LDH makes it improbable that this enzyme could leak from viable cells at this rate and suggests that replenishment of enzyme is effected by regeneration of liver cells.

In Chapter 7 it is discussed why some patients with acute myocardial infarction show an unexpectedly high release of ALT. Increased plasma ALT activity in patients with myocardial infarction has always been ascribed to some degree of central venous congestion with subsequent centrilobular liver necrosis. However, the expected extra AST release could not be demonstrated in these patients. Further, the time course of release of ALT does not conform to the liver, but to the heart. It is concluded that in a subset of patients with severe myocardial disease not the liver, but the heart becomes a source of ALT release and this finding is confirmed by determination of enzyme activities in hearts obtained from patients who died from myocardial infarction.

The results of the last chapter demonstrate that complex enzyme patterns in plasma can be analyzed successfully by means of quantitation of enzyme release. This implies, for instance, that after liver transplantation the injury to the transplanted organ can probably be differentiated from surgical trauma and the effects of anaesthesia. This seems a promising field of future application of the methods developed in this thesis. In general, calculation of cumulative enzyme release will provide accurate, quantitative data on liver injury. These data will contribute to a better understanding of the natural course of liver disease and the effect of therapeutical interventions.

SAMENVATTING

De laatste dertig jaar zijn de plasmabepalingen van leverenzymen, zoals alanine aminotransferase (ALT), aspartaat aminotransferase (AST), lactaat dehydrogenase (LDH), alkalische fosfatase (AP), gamma-glutamyl transferase (GGT), ornithine carbamyl transferase (OCT) en glutamaat dehydrogenase (GLDH) toenemend gebruikt voor de diagnostiek van leveraandoeningen. In tegenstelling tot de situatie bij het hart, zijn de enzymuitstortingen uit de lever zelden gebruikt om de omvang van orgaanbeschadiging vast te stellen. Necrotisch weefsel wordt in het myocard niet vervangen door nieuwe hartspiercellen en daarom weerspiegelt enzymverlies in het myocard het directe verlies van functioneel weefsel. De lever daarentegen heeft een grote regeneratieve capaciteit en schatting van enzymuitstorting uit de lever kan om die reden niet direct aan de restfunctie van dat orgaan gerelateerd worden. Ondanks deze beperking echter, is de lever vanuit het standpunt van de klinisch enzymoloog veel interessanter dan het hart. Verschillende vormen van leverbeschadiging leiden tot andere enzym patronen in het plasma. Zo zal bij een afsluiting van de afvoerende galwegen een ophoping van galzouten optreden en deze kunnen een detergerende werking uitoefenen op membranen en membraangebonden enzymen kunnen daardoor vrijkomen. De levercellen reageren daarop met inductie van membraangebonden enzymen zonder kennelijk verder veel schade te ondervinden.

Een flinke uitstorting van cytoplasmatische leverenzymen met beperkte of vertraagde uitstorting van mitochondriale enzymen lijkt te duiden op een primaire beschadiging van de levercelmembraan in verschillende vormen van toxische levercelbeschadiging, terwijl daarentegen het gelijktijdig vrijkomen van enzymen uit verschillende celorganellen veeleer waargenomen wordt bij acute necrose na shock of rechtsdecompensatie.

Ten gevolge van inductie of inhibitie van synthese van verschillende enzymen, kan bij verschillende ziekten de enzyminhoud van leverweefsel ingrijpend gewijzigd worden en het zou van grote diagnostische waarde zijn als dergelijke veranderingen opgespoord kunnen worden uit veranderingen in de verhouding van uitgestorte enzymen in plasma. Gegevens over intracellulaire turnover van verschillende enzymen kunnen gerelateerd worden aan het dagelijks verlies van enzymen in plasma tijdens chronische leveraandoeningen. Hieruit kunnen weer belangrijke conclusies getrokken worden over de bijdrage van hetzij integraal celverval, hetzij het lekken van enzymen uit levende cellen als het belangrijkste mechanisme van enzymuitstorting, en over de regeneratiecapaciteit van de lever.

Eenvoudige meting van plasma enzymactiviteit is niet voldoende om dergelijke vraagstellingen te beantwoorden. Een verwarrend beeld van de totale uitgestorte enzymactiviteit is het resultaat als geen rekening gehouden wordt met enzymspecifieke eliminatieconstanten uit plasma en de uitwisseling van enzymen tussen vasculaire en extravasculaire compartimenten. Bovendien kan het tijdsverloop van de uitstorting het enzymbeeld in plasma beïnvloeden: bij een langdurige chronische uitstorting zal dit effect anders zijn dan bij een acuut, kortdurend vrijkomen van enzymen.

Het belangrijkste doel van dit proefschrift is om dit soort beperkingen te overwinnen en methoden te ontwikkelen die het mogelijk maken de cumulatieve uitstorting van enzymen in plasma te bepalen, rekening houdend met intravasculaire afbraak, extravasatie en nalevering van enzymen uit het extravasculaire compartiment.

In Hoofdstuk 1 worden de problemen besproken die optreden als men de enzymuitstorting uit de lever wil kwantificeren en interpreteren. De methoden, waarmee de enzymactiviteiten worden bepaald worden hier eveneens beschreven. Voor de meeste enzymen zijn het standaard spectrofotometrische bepalingen, gewoonlijk verricht met commercieel verkrijgbare testkits. Ten behoeve van de bepaling van de OCT activiteit is een nieuwe methode ontwikkeld (Hoofdstuk 2), die onwenselijke ammoniakvorming uit eiwitten en ureum omzeilt.

Zoals besproken moet men de FCR constanten kennen vooraleer de cumulatieve uitstorting van de leverenzymen uitgerekend kan worden. Een methode, waarmee deze parameters geschat kunnen worden, wordt uiteengezet in Hoofdstuk 3, en deze wordt toegepast op de tijd-activiteit curves van tien nauwkeurig geselecteerde patiënten met acute enzymuitstorting. Het blijkt, dat de schijnbare verdwijningsconstanten van enzymactiviteiten uit plasma, in de literatuur gemeld, in het algemeen de werkelijke FCR waarden met een factor 1,5 à 3 onderschatten.

Met behulp van de aldus verkregen waarden van FCR(AST), FCR(ALT) en FCR(LDH) wordt vervolgens de cumulatieve uitstorting in plasma uitgerekend en deze uitstorting blijkt volledig in verhouding tot de activiteit van de betreffende enzymen in leverweefsel te geschieden. Dit geeft aan dat veranderde enzymactiviteiten in leverweefsel waarschijnlijk opgespoord kunnen worden met behulp van de veranderde ratio's van cumulatieve enzymuitstorting in plasma. Voorts blijkt de gemiddelde omvang van leverschade in deze groep patiënten aanzienlijk te zijn en overeen te komen met meer dan 400 gramequivalenten leverweefsel.

Een iets andere methode om de FCR waarden te schatten werd gebruikt in Hoofdstuk 4 voor drie mitochondriale enzymen, mAST, OCT en GLDH. Omdat bij de selectie van patiënten de aanwezigheid van een initiële stijging van de enzymactiviteit als criterium gebruikt is (noodzakelijk om de verhouding van vrijgekomen activiteiten te schatten - vgl. Hoofdstuk 3), heeft dit en passant ongewoon complete curves van mitochondrial enzymuitstorting opgeleverd. De mAST activiteit gemeten in acute levernecrose blijkt veel hoger te zijn dan tevoren gepubliceerd, waarschijnlijk enerzijds doordat zo vroeg gemeten werd en anderzijds doordat mAST zeer snel wordt afgebroken. Een opmerkelijke synchroniciteit van cytoplasmatische en mitochondriale enzymuitstorting werd waargenomen, die vraagtekens plaatst bij de validiteit van het reperfusiemodel voor tijdelijke ischemie in vivo. Daarbij wordt namelijk juist een vertraging

gevonden in het vrijkomen van de mitochondriale enzymfractie. Waarschijnlijk resulteert reperfusieschade in deze modellen in selectieve beschadiging van de plasmamembraan (Hoofdstuk 4).

Wat betreft het belang van enzymen als indices van levercelnecrose, moet hier de omgewoon complete uitstorting van OCT en mAST genoemd worden, in tegenstelling tot GLDH. Deze waarneming onderstreept nog eens het nut van OCT als leverspecifiek enzym (Hoofdstuk 4), te meer waar methodologische problemen nu zijn opgelost (Hoofdstuk 2).

De waarden van FCR(GGT) en FCR(AP) zijn geschat in patiënten met acute galwegafsluiting (Hoofdstuk 5). De schatting is gebaseerd op de zeer trage eliminatie van deze beide enzymen, waardoor de verdwijning meer dan 100 uur na het acute moment gemeten kan worden, als aangenomen mag worden dat geen uitstorting meer plaatsvindt. In dat geval kan de FCR op eenvoudige wijze afgeleid worden uit de schijnbare verdwijningssnelheid.

De uitstorting van membraangebonden enzymen wijst niet op dreigende levercelnecrose. Integendeel, het lijkt of er een inverse relatie bestaat tussen de uitstorting van membraangebonden en cytoplasmatische enzymen. Langdurige blootstelling aan galzouten lijkt eerst inductie en solubilisatie van membraangebonden enzymen te veroorzaken en uiteindelijk pas te leiden tot celnecrose ten gevolge van chronische detergentschade.

Een afgenomen LDH inhoud bij patiënten met acute galwegobstructie werd aangetoond door middel van veranderde verhoudingen van cumulatieve uitgestorte leverenzymen. Dit wordt bevestigd door gegevens uit de literatuur, verkregen uit bipten van leverweefsel van patiënten met acute galwegobstructie. Daar de intracellulaire omzetting van LDH nogal langzaam is (> 16 dagen), lijkt de lever aanzienlijk langer blootgesteld te zijn aan het effect van galzouten dan men op grond van de klachten van de patiënt zou aannemen.

Een afgenomen ALT inhoud van de lever, eveneens blijkt de veranderde verhoudingen van cumulatieve enzymuitstorting, werd aangetoond in Hoofdstuk 6. Dit is in overeenstemming met literatuurgegevens over enzymactiviteiten in leverbiopsieën bij patiënten met verschillende vormen van alcoholische leverbeschadiging. De bekende (verhoogde) AST/ALT ratio bij deze patiënten weerspiegelt deels de ALT afname in de lever, maar toont niet de volle omvang van dit effect. Zo nam bijvoorbeeld de AST/ALT ratio in plasma af, als de ziekte overging van een acute naar een chronische fase, terwijl de verhouding van cumulatief uitgestorte activiteit van deze enzymen onveranderd bleef.

Een dagelijkse cumulatieve enzymuitstorting overeenkomend met acht gram leverweefsel werd berekend in poliklinische patiënten met actief alcoholisch leverlijden. Het is in dit kader moeilijk voor te stellen dat bijvoorbeeld het aanvullen van LDH, gezien de langzame intracellulaire omzetting van dit enzym, plaatsvindt door verhoogde synthese in nog viabele levercellen. Veel waarschijnlijker lijkt dat aanvulling geschiedt door regeneratie van levercellen.

In Hoofdstuk 7 wordt de ALT verhoging van sommige patiënten met acuut myocardinfarct besproken. Een toegenomen plasma ALT bij deze patiënten wordt klassiek toegeschreven aan de gevolgen van leverstuwung met daardoor enige centro-

lobulaire levernecrose. De plasma AST verhoging van deze patiënten is dan niet alleen afkomstig uit het myocard, maar ook uit de lever. Echter, extra AST uitstorting kan bij deze patiënten niet aangetoond worden. Voorts past het tijdsverloop van uitstorting van ALT beter bij het myocard dan bij de lever. Hieruit wordt geconcludeerd dat in een deel van de patiënten met een myocardaandoening niet de lever, maar het hart de bron is van de ALT uitstorting en dit wordt bevestigd met enzymbepaling in harten van patiënten die overlijden na een acuut myocardinfarct.

Het in het laatste hoofdstuk beschreven resultaat toont aan dat complexe enzympanelen in plasma met sukses geanalyseerd kunnen worden door berekening van de enzymuitstorting. Zo moet het waarschijnlijk mogelijk zijn om bij levertransplantatie de beschadiging van de getransplanteerde lever te onderscheiden van het operatietrauma en de gevolgen van anaesthesie. Dit lijkt een veelbelovend gebied voor toekomstige toepassing van de methoden die in dit proefschrift werden ontwikkeld. In het algemeen zal de berekening van cumulatieve enzymuitstorting nauwkeuriger gegevens kunnen opleveren betreffende de schade toegebracht aan de lever en daardoor beter inzicht geven in het natuurlijk beloop van leveraandoeningen en het effect van therapeutische interventies.